

다이옥신 저해능에 대한 어성초의 항산화 활성 효과

하 배진

신라대학교 공과대학 생명공학전공
(2003년 5월 9일 접수; 2003년 6월 23일 채택)

Effects of *Houttuynia Cordata thunb* on Antioxidative Activity against TCDD Damage

Bae-Jin Ha

Department of Bioscience and biotechnology, college of Engineering, Silla University, Busan 617-736, Korea

(Manuscript received 9 May, 2003; accepted 23 June, 2003)

This study investigated the effects of *Houttuynia Cordata thunb*(HCT) administration on the biochemical parameters of function in liver of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) treated rats.

Houttuynia Cordata thunb (200mg/kg) was administered into rats intraperitoneally for four weeks , seven days after the injection of TCDD(1 μ g/kg).

We examined the antioxidative enzymatic activity by measuring the level of AST, ALT , SOD and Catalase in serum and liver tissue of rats.

HCT group showed 49% of inhibitive effect in AST activity compared to TANO group. ALT level of HCT group was decreased to the level of NO group.

SOD and Catalase in TANO group were lower than in NO group, but SOD and Catalase in HCT group were increased by 46% and by 50% respectively compared to TANO group.

Key Word : TCDD, *Houttuynia Cordata thunb*, Antioxidative enzyme, Hepatotoxicity

1. 서 론

다이옥신이라 함은 polychlorinated dibenzo-p-dioxin(PCDD)을 가리키며, polychlorinated dibenzo-furan(PCDF)을 포함하여 다이옥신 계열로 분류하는 경향이 있다. 다이옥신 계열의 화학구조는 두 개의 벤젠고리가 산소와 결합된 것으로서 벤젠고리에 붙은 염소의 위치 및 수에 따라 지금까지 PCDD가 약 75종, PCDF가 약 135종의 이성체가 밝혀져 있다. 현재까지 알려진 다이옥신 중 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)은 체내에서 가장 강한 독성을 유발하는 것으로 알려져 있다.¹⁾

TCDD는 Polyhalogenated aromatic hydrocarbon으로 페인 표백과정, 산불, 쓰레기 소각, 자동차 배기ガ스, 흡연 그리고 그 외 연소과정에서 발생한

다.²⁾

TCDD가 사람의 체내에 들어오면 먼저 지방조직에 축적되어 일부는 소변 및 담즙으로 배설되기는 하나 지용성이 강하여 일단 체내에(체내 반감기: 11년) 들어오면 거의 배설되지 않는 것이 특징이다.^{3,4)} 내분비계 장애물질로 체중 감소, 면역기능 억제, 간 기능과 지질대사 이상을 초래한다.^{5,6)} 또한, TCDD는 고농도 (30ng/kg 이상)에서 지방조직 보다 간에 더 많이 축적된다. 동물실험에서 TCDD에 의한 독성은 다양한 장기에서 나타나지만, 특히 간에서 심각한 문제를 일으킨다.^{7,8)}

어성초(魚腥草)는 삼백초과(Saururaceae)에 속하는 다년생 초본으로 학명이 *Houttuynia Cordata thunb*이며, 본초강목에서는 산열(散熱), 치상(治喪), 탈항(脫肛), 해독(解毒), 청열(淸熱), 이뇨(利尿), 소종(小鐘)의 효능을 보고하였다.⁹⁾

최근에는 어성초의 항산화성¹⁰⁾, 항종양¹¹⁾, 항백혈병¹²⁾, 고지혈 억제효과¹³⁾, 카드뮴에 대한 독성억제

Corresponding Author : Bae-Jin Ha, Department of Bioscience and biotechnology, college of Engineering, Silla University, Busan 617-736, Korea
Phone : +82-51-999-5466
E-mail : bjha@silla.ac.kr

하 배 진

효과¹⁴⁾, 브로모벤젠대사계에 미치는 어성초의 영향¹⁵⁾ 등이 보고 되었다.

본 연구에서는 TCDD로 유발되는 간독성을 대하여 어성초의 효과를 알아보기 위해 rat에 TCDD로 간독성을 유발시킴과 동시에 어성초를 투여하여 간독성 억제 효과를 조사하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험동물 및 식이

실험동물은 체중 40g(week-old rats)인 수컷 21마리를 대구 효창사이언스로부터 제공받았고 7일 동안 적응시켰다. 동물은 cage에 각각 분리시키고 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 했다. 실험동물들은 $22\pm1^{\circ}\text{C}$ 의 온도와 $60\pm5^{\circ}\text{C}$ 상대습도로 유지 시켰으며, 무개는 매일 측정하였다. 총 18마리의 rat를 Table 1.과 같이 나누었다.

NO군과 TANO군은 0.9% saline을 0.3ml씩 투여했으며 어성초군은 TCDD를 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 이 되게 복강내에 투여했다. TCDD 투여한지 일주일 후부터 HCT 군에 어성초를 $200\text{mg}/\text{kg}$ 이 되게 4주 동안 격일로 복강 내에 투여하였다. 나머지 군은 생리식염수를 투여하였다.

2.2. 혈액 및 간 채취

실험 종료 후 실험 동물을 ether 마취 하에서 개복 한 후 심장에서 채혈하여 30분 안에 3000rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였으며, 간은 적출하여 0.9% 생리 식염수로 세척하여 vial에 담아 -70°C Deep freezer에 보관하였다.

2.3. 혈청 중의 효소 활성 측정

혈청 중의 AST(aspartate aminotransferase)와 ALT(Alanine aminotransferase)는 Reitman-Frankel 법에 따라 조제된 kit시액(영동제약)을 사용하여 측정하였다.

Table 1. Experimental design of TCDD-treated rats

Experimental group	n ¹⁾	1 week	1~4 weeks	2~4 weeks
NO ²⁾	7	0.9 % saline		0.9 % saline
TANO ³⁾	7	TCDD		
HCT ⁴⁾	7	TCDD		<i>Houttuynia cordata Thunb</i>

n¹⁾ : number of experimental animals

NO²⁾ : Normal group

TANO³⁾ : TCDD-treated abnormal group ($1\mu\text{g}/\text{kg}$)

HCT⁴⁾ : *Houttuynia cordata Thunb* ($200\text{mg}/\text{kg}$) + TCDD($1\mu\text{g}/\text{kg}$)

정하였다.

AST(aspartate aminotransferase) substrate 1.0ml를 시험관에 취하여 37°C 수조에서 2~3분간 가온한 후 혈청 0.2ml의 혈청을 가하고 37°C 수조에서 60분간 반응시켰다. 여기에 1.0ml의 발색액을 가하여 mix 시킨 후 실온에서 20분간 방치하고 0.4N-NaOH 10.0ml를 가하여 충분히 혼합한 후 종류수를 대조로 하여 505nm에서 흡광도를 측정하였다.

AST와 실험방법은 동일하나, ALT(Alanine aminotransferase)의 측정은 ALT substrate 1.0ml를 사용하고 37°C 수조에서 30분간 반응시킨 후 505nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. 간 조직 중의 SOD(Superoxide Dismutase) 효소 활성 측정

0.2M K-Phosphate buffer, 1mM Xanthine, 1% Sodium Deoxycholate(DOC), 1.5mM KCN, 0.2mM cytochrome C를 넣은 mixture에 sample 3μl를 넣고, XOD (xanthine Oxidase)원액을 3μl를 넣어 mixing한 후 Elisa에 이용하여 550nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다. sample의 효소 활성도를 알아보기 위한 표준액으로서는 Sigma사의 superoxide dismutase standard를 사용하였다.

2.5. 간 조직 중 Catalase의 활성 측정

phosphate buffer(0.05M pH 7.0) 1.9ml에 sample(간 homogenate를 3000rpm에서 20분간 원심분리한 상등액) 0.1ml와 과산화수소 용액 1ml를 혼합하여 240nm에서 흡광도 감소를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 혈청중의 효소 활성도 변화

Aminotransferase는 α-amino acid에서 α-keto acid까지 α-amino group의 전달에 촉매 작용을 한다. 또한, transaminase라고 불리는 이 효소는 일반적으로 NH_4^+ 로 전환하기 위해 여러 가지 아미노산에서 α-ketoglutarate까지 α-amino group들을 보낸다. Aspartate aminotransferase는 이 효소들 중에서 α-ketoglutarate에 aspartate의 amino group을 전달하는 촉매작용을 한다. Alanine aminotransferase는 α-ketoglutarate에 alanine의 아미노기를 전달하는 촉매 작용을 한다.

TCDD로 간독성을 유도한 줄로부터 AST와 ALT의 어성초 효과를 Table 2.와 Fig 1.에 나타내었다. AST의 활성도는 NO군($32.00\text{unit}/\text{ml}$)에 비해서 TANO군($73.55\text{unit}/\text{ml}$)이 현저히 높게 나타났다. HCT군($53.30\text{unit}/\text{ml}$)은 TANO군보다 활성 낮게 나타났다. 혈청에서 AST 활성도는 HCT군이 TANO

다이옥신 저해능에 대한 어성초의 항산화 활성 효과

Table 2. Effect of HCT on AST and ALT activities in TCDD-treated rat serum

Experimental group	n ¹⁾	AST unit/ml	ALT unit/ml
NO ²⁾	6	32.04±4.24	25.97±8.58
TANO ³⁾	6	73.75±6.01	29.7±0.42
HCT ⁴⁾	6	53.3±6.60	27.15±0.75

All values are mean±SD

Significantly different from the value of TANO group at p<0.05, respectively

n¹⁾ : number of experimental animals

NO²⁾ : Noramal group

TANO³⁾ : TCDD-treated abnormal group (1 µg/kg)

HCT⁴⁾ : *Houttuynia cordata Thunb* (200mg/kg) + TCDD(1 µg/kg)

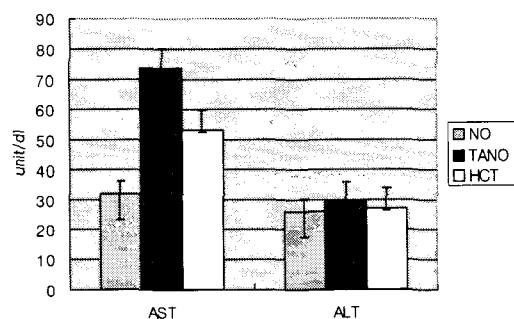


Fig. 1. Effect of HCT on AST and ALT activities in serum of TCDD-treated rat.

n¹⁾ : number of experimental animals

NO²⁾ : Noramal group

TANO³⁾ : TCDD-treated abnormal group (1 µg/kg)

HCT⁴⁾ : *Houttuynia cordata Thunb* (200mg/kg) + TCDD(1 µg/kg)

군과 비교해서 49%가 줄었다.

반면에, ALT활성도 변화는 TANO(29.70unit.ml)³⁾군과 NO(25.97unit.ml)군이 비슷하게 나왔다. HCT군(27.15unit/ml)의 활성도는 NO군보다 더 간 폐사의 발생률을 유도하고 반면에 ALT 활성 변화는 정상범위로 나타났다.

TANO군에서 AST, ALT 활성이 증가하는 경향을 볼 수 있는데 이는 TCDD에 의한 간손상 유발 물질이 간의 대사이상을 초래하여 간세포손상이 증대되어 나타난 것으로 사료된다. 이는 간독성을 일으키는 화학물질인 CCl₄에 의한 흰쥐의 간손상으로 AST, ALT의 수치가 정상군보다 높게 나온 Zimmerman의 결과¹⁶⁾와 같은 경향을 보였다.

3.2. 간 조직 중 SOD, Catalase 측정

우리 몸에 활성산소가 너무 많으면 암을 발생시키거나 노화를 촉진하는 등 나쁜 영향을 미친다. 이런 활성 산소는 과식을 하거나 과도한 스트레스, 지나친 흡연, 지나친 운동으로 인한 과호흡 등에 의해 그 양이 증가하는데, 이러한 활성산소를 분해시키는 역할을 하는 효소가 바로 SOD인 것이다. 이 효소는 25세 이후부터 SOD 발생량이 줄어들어서 신체는 점점 노화되어 간다. 생체내의 항산화 방어기구 중에서 효소적 방어계의 하나로 superoxide radical을 환원시켜 H₂O₂로 전환시킨다.^{17~19)}

Catalase는 microsome에서 합성되며 골지체로 이동 부착되어 세포내 peroxisome에 존재하는 내인적으로 생성된 H₂O₂를 H₂O와 O₂로 바꾸는 촉매역할을 한다.^{17~19)}

Catalase는 SOD에 비해 산화적 손상에 다소 민감한 것으로 사료되며²⁰⁾, 항산화제 효소들은 대사과정 중 발생하는 활성 산소종에 의해 그 활성이 비가역적으로 불활성화 될 수 있으며, 또한 지방산화에 의해 생성된 유리기도 제거하는 능력이 있는 것으로 보고 되어 있다.^{21~23)}

TCDD을 처치한 간조직중의 SOD 활성도는 Table 3. Fig 2.에 나타내었다. TANO군(4.50U/mg protein)의 SOD 활성도는 NO군(10.70U/mg protein)보다 낮게 나타났다. HCT(7.38U/mg protein)의 SOD 활성도는 TANO군에 비해 46% 증가하여 체내에 생성된 과산화지질을 효율적으로 제거해 주었을 것으로 생각된다. SOD는 활성산소(O₂⁻)를 H₂O₂와 O₂로 전환시켜 활성 산소에 의해 생기는 산화적 손상의 일차적 방어에 관여하며 비정상적으로 증가된 활성산소를 제거하기 위해 그 활성도가 높아진다는 Crapo²⁴⁾의 보고와 일치한다.

Table 3. Effect of HCT on SOD values in of liver homogenates TCDD-treated rat

Experimental group	n ¹⁾	SOD (U/mg protein)
NO ²⁾	6	10.70±1.16
TANO ³⁾	6	4.50±1.08
HCT ⁴⁾	6	7.38±1.56

All values are mean±SD

Significantly different from the value of TANO group at p<0.05, respectively

n¹⁾ : number of experimental animals

NO²⁾ : Noramal group

TANO³⁾ : TCDD-treated abnormal group (1 µg/kg)

HCT⁴⁾ : *Houttuynia cordata Thunb* (200mg/kg) + TCDD(1 µg/kg)

하 배 진

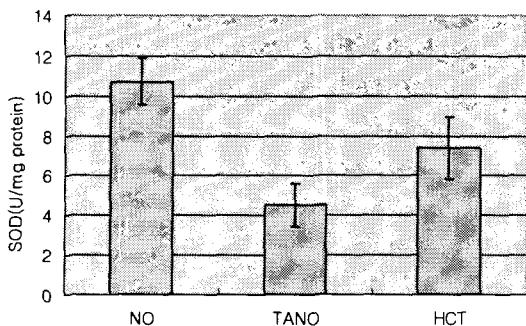


Fig. 2. Effect of HCT on SOD values in TCDD-treated rat liver homogenates.

n¹⁾ : number of experimental animals
 NO²⁾ : Noramal group
 TANO³⁾ : TCDD-treated abnormal group (1 µg/kg)
 HCT⁴⁾ : *Houttuynia cordata Thunb* (200mg/kg) + TCDD(1 µg/kg)

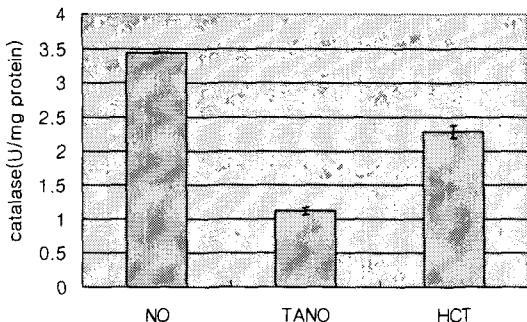


Fig. 3. Effect of HCT on catalase values in liver homogenates of TCDD-treated rat.

n¹⁾ : number of experimental animals
 NO²⁾ : Noramal group
 TANO³⁾ : TCDD-treated abnormal group (1 µg/kg)
 HCT⁴⁾ : *Houttuynia cordata Thunb* (200mg/kg) + TCDD(1 µg/kg)

Table 4. Effect of HCT on catalase values in TCDD-treated rat liver homogenates

Experimental group	n ¹⁾	Catalase (U/mg protein)
NO ²⁾	6	3.44±0.01
TANO ³⁾	6	1.12±0.05
HCT ⁴⁾	6	2.28±0.09

All values are mean±SD

Significantly different from the value of TANO group at p<0.05, respectively

n¹⁾ : number of experimental animals

NO²⁾ : Noramal group

TANO³⁾ : TCDD-treated abnormal group (1 µg/kg)

HCT⁴⁾ : *Houttuynia cordata Thunb* (200mg/kg) + TCDD(1 µg/kg)

TCDD을 처치한 간조직중의 Catalase 활성도는 Table 4, Fig 3.에 나타내었다.

TANO군(1.12mU/mg protein)의 Catalase 효과는 NO군(3.44mU/mg protein) 보다 훨씬 낮게 나타났다. HCT군의 간 조직중의 Catalase 활성도는 TANO군과 비교하여 높게 나타났다. 이는 TCDD에 의해 형성된 free radical의 생성을 억제시킨 결과로 사료된다.

4. 결 론

여성초가 TCDD에 의한 rat의 항산화 효소 활성(SOD, CAT)을 관찰하기 위해 NO, TANO, HCT 군으로 나누어서 TCDD를 투여하고 4주동안 물질을 투여한 후 회생시켜서 생체 내 간 조직 활성 효

과 및 항산화 효과를 관찰하였다. 그 결과

- AST 활성도는 HCT군이 TANO군과 비교해서 49%의 억제 효과를 보였다. 반면에, ALT활성도는 TANO(29.70unit.ml)군에 비해 68%의 억제 효과를 보였다.
- SOD는 TANO군(4.50U/mg protein)이 NO군(10.70U/mg protein)보다 낮게 나타났고 HCT(7.38U/mg protein)는 46%의 증가를 보였다.
- Catalase는 TANO군(1.12mmg protein)의 효과는 NO(3.44mU/mg protein)군 보다 훨씬 낮게 나타났다. HCT군의 간의 catalase 활성도는 TANO 군과 비교하여 50% 증가를 보였다.

참 고 문 헌

- Pohjanvurta, R. and J. Tuomisto, 1994, Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals : effects, mechanisms, and animal models, Pharmacol. Rev., 46, 483-549.
- Hutzinger, O., G. G. Choudhry, B. G. Chittim and L. E. John-ston, 1985, Formation of polychlorinated dibenzofurans and dioxins during combustion, electrical equipment fires and PCB incineration, Environ Health Perspect, 60, 3-9.
- Byard, J. L., 1987, The toxicological significance of 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-p-dioxin and related compounds in human adipose tissue, J. Toxicol. Environ. Health, 22, 381-403.
- Piot, H. C., T. Goldworthy, H. A. Campbell and A. Poland, 1980, Quantitative evaluation of the

다이옥신 저해능에 대한 어성초의 항산화 활성 효과

- promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine, *Cancer Res.*, 40, 3616-3620.
- 5) Huff, J., G. Lucier and A. Tritscher, 1994, Carcinogenesis of TCDD, Experimental, mechanistic and epidemiologic evidence, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 34, 343-372.
- 6) Mukerjee, D., 1998, Health impact of polychlorinated di-benzo-p-dioxin: a critical review. *J. Air Waste Manag. Assoc.*, 48, 157-165.
- 7) Hook, G. E., J. K. Haseman and G. W. Lucier, 1975, Induction and suppression of hepatic and extrahepatic microsomal foreign-compound metabolizing enzyme systems by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, *Chem. Biol. Interact.*, 10, 99-214.
- 8) Newster, D. W., B. V. Madhukar and F. Matsumura, 1982, Influence of 2,3,7,8-TCDD on the protein composition of the plasma membrane of hepatic cells from the rat, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 107, 68-74.
- 9) 신민교, 994, 임상초본학, 영림사, 336-37pp.
- 10) Lee, Y. J., D. H. Shin, Y. S. Jang and J. I. Shin, 1993, Antioxidative effects of fractions from sequential ethanol extracts of *Houttuynia cordata*, *Portulacaceae* and sesame cake, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 25, 683-686.
- 11) Kim, S. K., S. Y. Ryu, S. U. Choi and Y. S. Kim, 2001, Cytotoxic alkaloids from *Houttuynia cordata*, *Arch. Pharm. Res.*, 24, 518-521.
- 12) Chang, V. S., L. C. Chiang, C. C. Chen, L. T. Liu, K. C. Wang and C. C. Lin, 2001, Anti-leukemic activity of *Bidens pilosa* L. var. minor (Blume) sherff and *Houttuynia cordata*, Thunb. *Am. J. Chin. Med.*, 29, 303-312.
- 13) Chung, C. K., S. S. Ham, S. Y. Lee, D. H. Oh, S. Y. Choi, I. J. Kang and S. M. Nam, 1999, Effects of *Houttuynia cordata* ethanol extracts on serum lipids and antioxidant enzymes in rats fed high fat diet, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 28, 205-211.
- 14) Lee, J. H., S. I. Jeong, I. S. You, S. K. Kim, K. N. Lee, D. S. Han and S. H. Baek, 2001, The inhibitory effects of the methanol extract of *Houttuynia cordata* Thunb against cadmium induced cytotoxicity(V), *Kor. J. Pharmacogn.*, 31, 228-234.
- 15) Park, J. C., J. M. Hur, J. G. Park, S. J. Park, J. H. Lee, N. J. Sung, M. R. Choi, S. H. Song, M. S. Kim and J. W. Choi, 2000, The effects of *Houttuynia cordata* on the hepatic bromobenzene metabolizing enzyme system in rats and isolation of phenolic compounds, *Kor. J. Pharmacogn.*, 31, 228-234.
- 16) Zimmerman, H. J., 1981, Chemical hepatic injury and its detection: In *Toxicology of the liver*, Plass, G. L. and W. R. Hewitt(eds), Raven Press, P. L.
- 17) Roberts, V. A., N. J. Rosenbrough, A. S. Farr and R. J. Randall, 1951, Protein Measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 256-259.
- 18) Rosen, D. R., et al., 1993, Mutations with familial amyotrophic lateral sclerosis, *Nature*, 362, 59-62.
- 19) Tainer, J. A., E. D. Getzoff, J. S. Richardson and D. C. Richardson, 1983, Structure and mechanism of Cu, Zn, superoxide dismutase, *Nature*, 306, 274-287.
- 20) Vendemaile, G., E. Altomare, I. Grattagliano and O. Albano, 1989, *J. Hepatol.*, 9, 359.
- 21) Von, S., 1987, In *The Chemical Basis of Radiation of biology*, Tylor and Francis.(ed.), London, 31pp.
- 22) Fridovich, I., 1986, Biologic effects of the superoxide radicals, *Arch. Biochem. Biophys.*, 247, 1-15.
- 23) 김문홍, 1985, 제주식물도감, 태화인쇄사, 77pp.
- 24) Crapo, H. C., M. J. McCord and I. Fridovich, 1978, Preparation and assay of superoxide dismutase, In *Methods in enzymology*, Fleischer, S. and I. Packer, (eds), Academic Press, New York, 52, 382-393.